

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, докт. мед. наук, проф., академик НАН Украины;
И.В. РАССОХА, канд. биол. наук, ИПК и К НАНУ, г. Харьков

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОКОМПОЗИТНЫХ ПОКРЫТИЙ

В статье обсуждаются перспективы разработки методов культивирования стволовых клеток с использованием нанокompозитных подложек.

The article represents the discussion of perspectives for development of stem cells cultivation methods with use of nanocomposite substrates.

Одной из перспективных сфер реализации высокотехнологических проектов, аккумулирующих биологические и медицинские достижения последних десятилетий, является нанобиомедицина.

В литературе освещены вопросы, касающиеся изучения возможностей применения нанотехнологий в медицине, в частности – тканевой инженерии [1].

Тканевая инженерия – концептуально новая стратегия лечения многих заболеваний и дефектов организма.

В ее основе лежит создание биологических заменителей тканей и органов.

В своих методах она успешно сочетает применение новейших технологий молекулярно-клеточной биологии и последних достижений материаловедения [2].

Примером тканевой инженерии, позволяющей индуцировать регенерационные процессы в поврежденных органах и тканях живого организма, является использование клеточных каркасов (scaffolds) или матриксов, задающих структуру и геометрию новых тканей.

В обсуждении вопросов, связанных с применением биоматериалов используемых для создания имплантов-носителей (scaffold-технологии) акцентировано внимание на необходимости изучения различных их характеристик (биосовместимость, биоактивность, биотоксичность).

Альтернативным вариантом тканевой инженерии является разработка эффективных биомедицинских технологий получения материала в системе *in vitro* в виде клеточных суспензий с целью их применения в клинической практике.

В широком спектре клеток, применяемых в клеточно-тканевой терапии, особого внимания заслуживают мезенхимальные стволовые клетки (МСК).

Многочисленные экспериментальные работы отечественных и зарубежных исследовательских групп демонстрируют высокую пластичность и способность этих клеток в определенных условиях дифференцироваться в различных гистогенетических направлениях [3].

Потенциал использования МСК распространяется от регенерационной терапии при лечении повреждений органов и тканей до коррекции состояния нейроиммуноэндокринного блока организма за счет продукции широкого спектра медиаторов [4, 5, 6, 7, 8].

Востребованность МСК как корректора многих патологических состояний, вполне логична и базируется на их возможности проявлять иммуномодулирующий потенциал [9, 10]. Функциональный статус этих клеток определяется способностью мигрировать в поврежденные участки организма-реципиента, продуцировать там цитокины (ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-14), факторы роста (мезенхимальный колониестимулирующий фактор, грануломоноцитарный колониестимулирующий фактор) и многие другие регуляторные молекулы с целью реализации (локально и дистантно) регенеративных процессов и минимизации иммунновоспалительных реакций. Согласно данным литературы [3, 6] МСК, обладая слабыми иммуногенными свойствами, проявляют высокую иммунносупрессивную активность в отношении аллогенных и аутореактивных Т- и В-клеток. Например, в экспериментах *in vivo* показано, что инфузия HLA-несовместимых МСК увеличивает время жизни аллогенных кожных трансплантатов [12]. Иммуномодулирующие свойства МСК являются обоснованием целесообразности их применения для лечения широкого спектра аутоиммунных заболеваний, включая одну из их форм – болезнь трансплантат против хозяина (БТПХ) [8, 10]. Как правило, для этих целей используют культивируемые *in vitro* клетки стромы костного мозга. Несмотря на большое количество публикаций посвященных изучению МСК, до конца не изучены многие вопросы, касающиеся выделения, культивирования, функционирования их в системе *in vivo*. Как положительные, так и отрицательные стороны имеют, например, протоколы выращивания МСК.

Согласно данным литературы, в клетках на поздних пассажах культивирования появляются признаки старения и апоптоза [6]. Существует мнение, что эти отрицательные моменты культивирования могут быть связаны не только с геномными или постгеномными изменениями делящихся клеток, но и с физико-химическими особенностями матриц-носителей на которых их выращивают. В связи с этим, очевидна необходимость совершенствования и разработки принципиально новых технологий культивирования этих клеток. Получению биотерапевтических препаратов МСК в достаточном количестве и с определенным исходным статусом могут способствовать более детальная идентификация и изучение факторов позволяющих регулировать направление их дифференцировки и потенциал пролиферации. Манипуляция “регулирующими” средами и ростовыми факторами не является, по-видимому, единственным и оптимальным подходом управления состоянием клеток-предшественников, включая и МСК. На наш взгляд, мощным механизмом управления их структурно-функциональным состоянием в системе *in vitro* является модификация взаимодействия клеток с субстратами-подложками. На примере культивирования фибробластов и макрофагов на матричных носителях (титан и его сплавы, ниобий, нержавеющая сталь, полимеры), показана важная роль природы поверхности биоматериала (рельефность, гидрофобно-гидрофильные характеристики, химический состав) в определении структурно-функциональных характеристик этих клеток [13, 14, 15].

Alberktsson T. и Wennerberg [16] установили зависимость адгезивного потенциала клеток от рельефа поверхностного слоя биоматериала. В своей работе они показали, что умеренно грубая поверхность покрытия (глубина ям 1-2 μm) вызывала более выраженную клеточную реакцию, по сравнению с гладкой или более грубой поверхностями (глубина ям 4 – 8 μm). Зависимость адгезии клеток от микротопографии была также продемонстрирована на примере фибробластов, посаженных на полимер с модифицированной поверхностью, к которой они проявляли выраженную адгезию. При этом в клетках наблюдалось формирование актиновых, тубулиновых, виментиновых и винкулиновых волокон.

Согласно данным литературы [17, 18], виментиновые и винкулиновые нити цитоскелета являются связующим звеном между цитоплазматической и ядерной мембранами. Поэтому, модификация ультраструктуры поверхности подложки влечет за собой развитие каскадных реакций приводящих к перепрограммированию внутриклеточных сигнальных систем. Некоторые авторы

исследовали динамику фокальной адгезии остеобластов, которые культивировали на стальной и титановой поверхностях с различной степенью шероховатости, а также, пластике, покрытом коллагеном [19]. Было установлено, что фокальная адгезия определяется химическими свойствами биопокрытий и зависит от функционального состояния микрофиламентов цитоскелета клетки. При этом авторы подчеркивают, что фокальные контакты, осуществляемые в адгезионных локусах, по сути, являются связующим звеном между внеклеточным матриксом (или поверхностью другой контактирующей клетки) и цитоплазмой клеток.

Роль химической структуры биоматериала и ее влияние на дифференцировку остеобластов и минерализацию матрикса, зависимую от изменения клеточной пролиферации была изучена [20]. Авторы показали, что генерация на поверхности биопокрытия OH– и NH₂– групп модулирует генную экспрессию в остеобластах, активирует ферментативную деятельность щелочной фосфатазы, способствует минерализации матрикса. Эти химически активные группы оказывали свое влияние посредством специфического связывания с теми или иными субъединицами трансмембранных белков – интегринов, которые по-разному модифицировали матриксную минерализацию клеток. Роль интегриновых рецепторов в регуляции различных аспектов функционирования клеток на первоначальных этапах их взаимодействия с подложками представлена на рисунке.

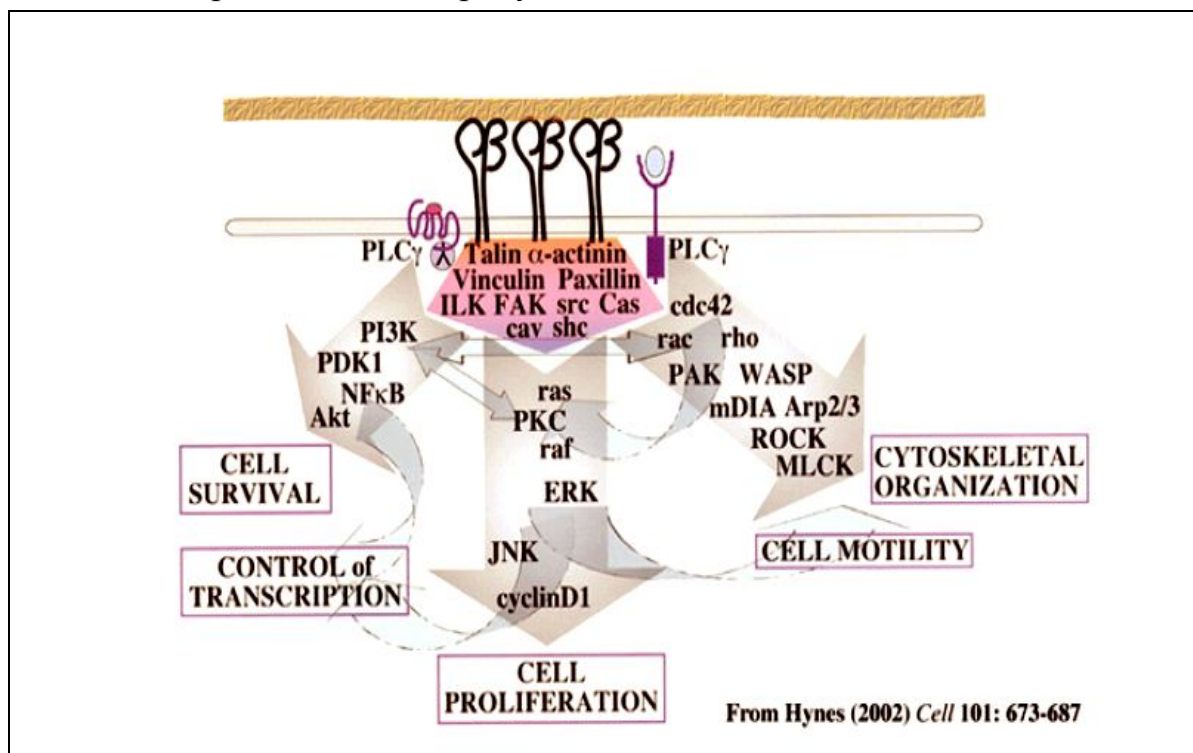


Рисунок – Модель интегриновой сигнализации

Интегрины посредством компонентов примембранного цитоскелета (эзрин, моезин, радиксин) и актинсвязывающих белков соединяются с актином цитоскелета. После этого формируются фокальные контакты – дискретные надмолекулярные комплексы, содержащие структурные белки (винкулин, таллин, α -актин) и сигнальные молекулы (FAC, Src, паксиллин).

На заключительных этапах взаимодействия происходят структурные изменения адгезивных локусов, что приводит к изменению спектра экспрессии ряда генов. В итоге регулируются три уровня клеточного ответа: транскрипция, трансляция, а также уровень регуляции продукции белков. Учитывая важную роль компонентов цитоскелета в пространственно-временной обработки информации, поступающей в клетку, можно резюмировать, что наноматериал, выступающий в роли биопокрытий, «предопределяет» клеточную судьбу и является своеобразной детерминантой поведения отдельно взятой клетки.

Особое внимание в ряде работ уделяется изучению поверхностной энергии различных покрытий, ее дисперсионной и полярной составляющих и их влияние на клеточные культуры [21]. Продемонстрирована, например, корреляция между поверхностными свойствами покрытий и пролиферативным потенциалом фибробластов: высокие показатели поверхностной энергии и фракционной полярности покрытий стимулировали пролиферацию исследуемых клеток.

Архиважным является изучение влияния поверхностных свойств биоматериалов на экспрессию генов [22]. В работах на эту тему было показано изменение экспрессии многих генов, вовлеченных в реализацию фокальной адгезии остеобластов культивируемых на титановых полимерах с разной поверхностью, генов, кодирующих факторы роста, цитокины (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6), генов контролирующих клеточный цикл, а также генов вовлеченных в реализацию апоптоза. Kato S, Akagi T, Sugimura K и соавт. продемонстрировали варьирование экспрессии гена онкосупрессора p53 и протоонкогенов c-fos, c-myc в зависимости от степени гидрофобности поверхности биопокрытия [23]. Указывается на изменение экспрессии некоторых генов в условиях эмиссии ионов из используемого металла в окружающие ткани. Существенно то, что повышение некой пороговой величины эмиссии ионов титана приводит к снижению темпов роста клеток за счет изменения соотношения экспрессии генов семейства Bcl-2/Bax в сторону проапоптозных белков с активацией апоптоза.

Таким образом, приведенная выше информация убедительно демонстрирует возможность управления состоянием различных клеток путем модификации структурно-конформационных, физических и химических свойств покрытий на которых они культивируются. Что же касается влияния наноматериалов на функциональное состояние клеток стволового компартмента, то этих данных явно недостаточно для получения убедительного обобщенного результата. Причиной этому может быть использование в экспериментальных моделях клеток разного уровня “стволовости”, условий их культивирования и т. д. Не вызывает сомнения факт различий коммуникационного аппарата (рецепторный репертуар, трансдукционные сигнальные пути и т.д.) клеток входящих в континуум этих элементов и, соответственно, разного их ответа на наноструктуры матриц-носителей. При этом особую актуальность приобретают вопросы их получения, стандартизации, выбор методов нанесения и оценки влияния на структурно-функциональный статус стволовых клеток при культивировании.

Понимание закономерностей механизмов взаимодействия наноматериалов с биологическими объектами и поиск путей варьирования их структурными и физико-химическими характеристиками дает возможность управления такими параметрами как адгезия, пролиферация, дифференциация клеток в заданном направлении в процессе их культивирования *in vitro*. Это, в свою очередь, открывает перспективы развития методов тканевой инженерии на основе использования наноматериалов, которые являются, на наш взгляд, хотя и малоизученным, но перспективным субстратом для культивирования клеток стволового компартмента, в частности МСК, востребованность которых в клинической практике определяет актуальность такого рода разработок.

Работа подготовлена в рамках конкурсной тематики НАН Украины и Украинского научно-технологического центра по программе «Програма цільових досліджень та розвиваючих ініціатив».

Список литературы: 1. *Williams D.* Benefit and risk in tissue engineering / *D. Williams* // *Materialstudy*. – 2004. – № 5. – P. 24 – 29. 2. *Heungoso S.* Biomimetic materials for tissue engineering / *S. Heungoso, J. Seongbong, G. Antonios* // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P. 4353 – 4364. 3. *Barry F.P.* Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / *F.P. Barry, M.J. Murphy* // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2004. – № 36. – P. 568 – 584. 4. *Гольцев А.Н.* Исследование терапевтического эффекта трансфузии криоконсервированных стволовых кроветворных клеток из разных источников при лечении экспериментального адьювантного артрита / [А.Н. Гольцев,

Т.Г. Дубрава, Ю.А. Козлова и др.] // Трансплантология. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 28 – 30. 5. Цыб А.Ф. Морфофункциональное изучение терапевтической эффективности мезенхимальных и нейрональных стволовых клеток при диффузной травме головного мозга животных / А.Ф. Цыб // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – № 31. – С. 23 – 37. 6. Bobis S. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications / S. Bobis, D. Jarocha, M. Majka // Folia Histochem Cytobiol. – 2006. – V. 44, № 4. – P. 215 – 230. 7. Blanco Y. Autologous haematopoietic-stem-cell transplantation for multiple sclerosis / Y. Blanco, A. Saiz, E. Carreras // Lancet Neurol. – 2005. – V. 4, № 1. – P. 54 – 63. 8. Dazzi F. Cell therapy for autoimmune diseases / F. Dazzi, M. Jacob, van Laar, A. Cope // Arthritis Res Ther. – 2007. – V. 9, № 2. – P. 206 – 212. 9. Csaki C. Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering / C. Csaki, P.R.A. Schneider, M. Shakibaei // Ann. Anat. 2008. – V. 18. – P. 395 – 412. 10. Bartholomew A.. Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance / [A. Bartholomew, D. Polchert, E. Szilagyi et al.] // Transplantation. – 2009. – V. 15. – P. 55 – 57. 11 Gao J. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion / [J. Gao, J.E. Dennis, R.F. Muzic et al.] // Cell tissues organs. – 2001. – V. 169, № 1. – P. 12 – 20. 12. Blanc K. NLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells / [K. Blanc, C. Tammic, K. Rosendahl et al.] // Exp. Hematol. – 2003. – V. 31. – P. 890 – 896. 13. Anselme K. The relative influence of the topography and chemistry of Ti6Al4V surfaces on osteoblastic cell behaviour / [K. Anselme, P. Linez, M.Bigerelle et al.] // Biomaterials. – 2000. – V. 21. – P. 1567 – 1577. 14. Deligaianni D.D. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation, and detachment strength / [D.D. Deligaianni, N.D. Katsala, P.G. Koutsoukos et al.] // Biomaterials. – 2001. – V. 22. – P. 87 – 96. 15. Dalby M.J. Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size / [M.J. Dalby, N. Gadegaard, M.O. Riehle et al.] // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2004. – V. 36. – P. 2005 – 2015. 16. Alberktsson T. Oral implant surfaces: part 2. Review focusing on clinical knowledge of different surfaces / T. Alberktsson, A. Wennerberg // Int. J. Prosthodont. – 2004. – V 17. – P. 544 – 564. 17. Dalby M.J. Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia / [M.J. Dalby M.O. Riehle, H. Johnstone et al.] // Cell Biology International. – 2004. – V. 28. – P. 229 – 236. 18. Dal-by M.J. Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography / [M.J. Dalby, M.O. Riehle, S. Yarwood et al.] // Experimental Cell Res. – 2003. – V. 284. – P. 274 – 282. 19. Diener A. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics / [A. Diener, B. Nebe, F. Lüthen et al.] // Biomaterials. – 2005. – V. 26, № 4. – P. 383 – 392. 20. Benjamin G.K. Quantitative methods for analysis of integrin binding and focal adhesion formation on biomaterial surfaces / G.K. Benjamin, J.G. Andres // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – P. 413 – 418. 21. Zykova A. Surface parameters modification by multilayer coatings deposition for biomedical applications / [A. Zykova, V. Safonov, O. Virva et al.] // J. of Physics Conference Series, IOP Publishing. – 2008. – V. 113. – P. 15 – 19. 22. Ku C.H. Large-scale gene expression analysis of osteoblasts cultured on three different Ti-6AL-4V surface treatments / [C.H. Ku, M. Browne, P.J. Gregson et al.] // Biomaterials. – 2002. – V. 23. – P. 419 – 420. 23. Kato S. Evaluation of biological responses to polymeric by RT-PCR analysis iv: study of c-myc, c-fos and p53 mRNA expression / [S. Kato, T. Akagi, K. Sugimura et al.] // Biomaterials. – 2000. – V. 21. – P. 521 – 527.

Статья поступила в редколлегию 29.06.10